

(19)日本国特許庁 (JP)

(12)公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表2002-510038

(P2002-510038A)

(43)公表日 平成14年4月2日(2002.4.2)

(51)Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テーマコード ⁸ (参考)
G 0 1 N 33/576		G 0 1 N 33/576	Z 4 B 0 2 4
C 0 7 K 14/18		C 0 7 K 14/18	4 B 0 6 4
16/10		16/10	4 B 0 6 5
C 1 2 N 5/10		C 1 2 P 21/08	4 H 0 4 5
C 1 2 P 21/08		(C 1 2 P 21/08)	
審査請求 未請求 予審査請求 有 (全 37 頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号	特願2000-541203(P2000-541203)	(71)出願人	イノジエネティックス・ナムローゼ・フェンノートシャップ INNOGENETICS N. V.
(86) (22)出願日	平成11年3月29日(1999.3.29)		ベルギー、ベー-9052ヘント、テヒノロギーバリク 6番
(85)翻訳文提出日	平成12年9月27日(2000.9.27)	(72)発明者	ヘールト・メールテンス ベルギー、ベー-8310シント・クライス・ブルッヘ、ジルファースバレンストラート64番
(86)国際出願番号	PCT/EP99/02154	(72)発明者	エリック・デブラ ベルギー、ベー-9070デステルベルヘン、ブルフストラート58番
(87)国際公開番号	WO99/50301	(74)代理人	弁理士 青山 誠 (外1名)
(87)国際公開日	平成11年10月7日(1999.10.7)		最終頁に続く
(31)優先権主張番号	9 8 8 7 0 0 6 0 . 5		
(32)優先日	平成10年3月27日(1998.3.27)		
(33)優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		

(54)【発明の名称】 ウィルスエンベロープ蛋白中のエピトープおよびこれらのエピトープに対して指向された特異的抗体：宿主組織中のHCVウイルス抗原の検出のための使用

(57)【要約】

HCV蛋白上の2つの新たなエピトープに対する抗体が同定され、それらは宿主由来の組織または細胞における天然のHCVエンベロープ抗原の常套的な検出を可能にするものである。新たなエピトープは：E 1 領域 a a 3 0 7 - 3 2 6 およびE 2 のN末端超可変領域 a 3 9 5 - 4 1 5 である。驚くべきことに、我々は、E 2 の超可変ドメインの種々の配列と反応する抗体を特徴づけた。これらのエピトープに指向され、ウイルス抗原の常套的な検出を可能にする特異的モノクローナル抗体を記載する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 天然HCV蛋白抗原検出キットを製造するための、HCV E1蛋白のC末端領域 (aa227-383) またはHCV E2蛋白のN末端領域 (aa384-450) に特異的に結合する抗体の使用。

【請求項2】 該抗体が下記エピトープ：

HCV E1蛋白のaa307-326 (配列番号：30)

HCV E2蛋白のaa395-415 (配列番号：31)

のうち1つに特異的に結合するものである、請求項1記載の抗体の使用。

【請求項3】 該抗体がモノクローナル抗体である請求項1または2のいずれかに記載の抗体の使用。

【請求項4】 該抗体が受託番号98031214または98031215を有するECACC寄託物により分泌されるものである、請求項1ないし3のいずれか1項に記載の抗体の使用。

【請求項5】 請求項1ないし4のいずれかに記載の抗体の機能的に等価な変種もしくはフラグメントの使用。

【請求項6】 受託番号98031214を有するECACC寄託物により分泌されるモノクローナル抗体。

【請求項7】 請求項6記載の抗体の機能的に等価な変種もしくはフラグメント。

【請求項8】 受託番号98031214を有するECACC寄託物であるハイブリドーマ細胞系。

【請求項9】 HCV蛋白抗原を含む可能性のある試験試料を、請求項1ないし4のいずれかに記載の抗体または該抗体の機能的に等価な変種もしくはフラグメントと接触させて抗体-抗原複合体を形成させ、次いで、

該抗原-抗体複合体を適当なマーカーを用いて調べることを含む、天然HCV蛋白抗原の検出方法。

【請求項10】 該試験試料がヒト細胞または組織を含むものである請求項9記載の方法。

【請求項11】 該ヒト細胞が末梢血細胞である請求項10記載の方法。

【請求項12】 該ヒト組織が肝臓組織である請求項10記載の方法。

【請求項13】 請求項1ないし4のいずれかに記載の抗体または該抗体の機能的に等価な変種もしくはフラグメント、および

試験試料中のHCV蛋白抗原と該抗体または該抗体の機能的に等価な変種もしくはフラグメントとの間に形成された複合体を調べることを可能にする適当なマークー

を含む、天然HCV蛋白抗原を検出するためのキット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の分野

本発明は、HCVのE1およびE2蛋白の特異的エピトープに対して指向された抗体を用いて宿主組織中のウイルス抗原を検出することができるという知見に基づく。

【0002】

発明の背景

C型肝炎ウイルス（HCV）感染は先進国および発展途上国の両方における大きな健康上の問題である。世界の人口の約1ないし5%が当該ウイルスにかかっていると見積もられる。HCV感染は輸血に関連した肝炎の最も重要な原因と思われ、しばしば、慢性の肝臓障害に進行する。そのうえ、HCVが肝細胞癌腫の誘導に関与している証拠がある。したがって、信頼できる診断方法および有効な治療薬に対する要求が大きい。また、HCVに汚染された血液製品に関する高感度かつ特異的なスクリーニング方法ならびにHCVの培養方法も必要である。

【0003】

HCVは、少なくとも3つの構造蛋白および6つの非構造蛋白をコードする約9400個の塩基からなるプラス鎖RNAウイルスである。配列相同性に基づいて、構造蛋白は機能的に1つの單一コア蛋白および2つのエンベロープ蛋白E1およびE2に帰属されている。E1蛋白は192個のアミノ酸からなり、HCV遺伝子型に応じて5ないし6個のN-糖鎖付加部位を含む。E2蛋白はHCV遺伝子型に応じて9ないし11個のN-糖鎖付加部位を含む363ないし370個のアミノ酸からなる（調査するにはMajor and Feinstone, 1997; Maertens and Stuyver, 1997参照）。E1蛋白は種々の可変ドメインを含むが、E2蛋白は2個の超可変ドメインを含み、その主要ドメインは蛋白のN末端に存在している（Maertens and Stuyver, 1997）。エンベロープ蛋白は、エシェリシア・コリ（Escherichia coli）、昆虫細胞、酵母細胞および哺乳動物細胞において組換え法により生産されている。高等真核細胞の発現系、特に哺乳動物細胞培養の使用は優れた品質のエンベロープ蛋白を生じ、すなわち、それらの蛋白はは、Maertensら

に付与されたPCT/EP95/03031に記載されたように元の試料中の抗体により効果的に認識されるものである。

【0004】

現在、細胞または組織中のHCVの検出は、主としてウイルスRNAが示されることによっている。しかしながら、細胞または組織におけるRNAの検出は、RNA抽出後に逆転写またはネステッドPCRを用いるかあるいはin situ RT-PCRおよびハイブリダイゼーションを用いる煩わしい方法である。また、これらの手法は擬陽性を生じやすいので、ウイルスRNAの検出はもっぱら血清試料について行われている。血清および組織試料中のウイルス蛋白抗原の信頼できる検出方法は依然として存在しない。

【0005】

HCVの複製部位はまだ十分に解明されていない。当該ウイルスは肝細胞中で複製するということが一般的に受け入れられているが、リンパ組織のごとき他の組織中での複製についてはまだかなり議論の余地がある。それゆえ、細胞中のウイルス蛋白またはウイルス自体を検出するための信頼できる方法により、この問題が解決されるかもしれない。

【0006】

細胞中のウイルス蛋白の検出は、ウイルス蛋白に特異的に結合し、天然のHCV蛋白抗原（すなわち、HCV感染後に宿主により発現される抗原）を特異的に認識しうる抗体が無かったことにより妨げられていた。結果として、現在に至るまで、宿主細胞中のウイルスHCV蛋白の存在を示すことに関連した研究はごくわずかしかなかった（調査するにはGuido and Thung, 1996参照）。そのうえ、宿主由来の抗体はこれらの研究の多くに使用されていた。しかしながら、宿主由来の抗体を含む調合物は容易に再生産できず、これらの調合物は自己免疫抗体ならびに他の既知もしくは未知抗原に対する抗体により汚染される可能性がある。対照的に、組み換え抗体で免疫した動物において産生された抗体は所望の特異性を有することが知られている。再生産可能な品質を得るためにモノクローナル抗体も同様に好ましい。さらに、良好な品質の抗原を得るために、HCVのエンベロープ蛋白は哺乳動物発現系により産生される必要がある。現在、この発現

条件は理解できない問題を含んでいる。それゆえ、患者の組織標本中のHCVエンベロープ抗原を検出するのに使用できたモノクローナル抗体はごくわずかしか記載されていない。これらの抗体はE1のN末端領域、すなわちアミノ酸(aaa)192-226(Hiramatsu et al., 1992; Kaito et al., 1994)、あるいはE2のC末端ドメイン、すなわちaaa451-715(Sansonno et al., 1997a, 1997b)に指向されていた。しかしながら、これらの刊行物ならびにGuidoおよびThung(1996)によるレビューおよびLiang(1996)によるレビューから、血清および組織試料中の天然HCV蛋白抗原の効果的かつ常套的な検出を可能にする十分に特徴づけられた抗体に対する必要性がやはりあるということが明らかである。この必要性は、Driesおよび共同研究者(1999)による研究によって、最近確認された。Driesのグループは、肝臓生検試料においてHCV RNAを検出することができたので、HCV抗体陽性で血清RNA陰性である個体の61%がHCVのキャリヤであることを証明したが、抗体のパネルを用いる免疫組織化学によればこれらの症例の3分の1が検出可能であるに過ぎなかった。よって、肝臓生検におけるHCV抗原の常套的な検出はやはり感度不足である。また、血清または血漿のごとき体液中のウイルス抗原の検出は同じ問題により妨げられている。現在に至るまで、これらの体液中のコア抗原の検出を可能にする手法はわずかに1つだけ記載されているに過ぎない。しかしながら、その方法では、コア蛋白を検出するためには試料中に存在するコア蛋白を水酸化ナトリウムを用いて完全に変性させることを必要とする(Kashiwakuma et al., 1996)。

【0007】

それゆえ、まとめると、抗体にアクセス可能で、組織または体液試料中の抗体の検出を可能にする新たな特異的HCVエピトープの同定が緊急に必要である。HCVエンベロープ蛋白は、かかるエピトープを見出すための候補標的と推定される。なぜなら、これらの蛋白はすべての生物学的試料：体液、ウイルス膜上、ならびに感染初期段階(すなわち、ウイルス侵入段階)から完全な複製サイクルに至るまでの細胞に存在するはずだからである。しかしながら、これらのエンベロープ蛋白は非常に変化しやすいので、異なる遺伝子型のHCVに対して高い交差反応性を有する抗体が必要である。よって、かかるエピトープの同定およびH

C V の配列変種に対して高い交差反応性を有する抗体の検索について検討すべきである。

【0008】

本願は、H C V のエンベロープ蛋白中の特定のエピトープに対して指向される特異的モノクローナル抗体に関し、該抗体は患者の組織標本中のH C V抗原を検出しうるものである。全部で2つのかかるエピトープ、および対応抗体が見出された。それらのうち1つはエンベロープ蛋白E 1 のC末端領域 (a a 2 2 7 - 3 8 3) 中にあり、もう1つはE 2 のN末端超可変領域 (H V R) (a a 3 8 4 - 4 5 0) 中にある。後者の領域、より詳細には領域3 9 5 - 4 1 5 は超可変領域であると考えられているが、驚くべきことに我々は、E 2 のH V R の種々の既知配列と反応する抗体を特徴づけた。

【0009】

発明の目的

H C V に関する信頼できる診断方法、信頼できるワクチンおよび有効な治療薬を緊急に開発する必要があることは、文献から明らかである。また、H C V が混入した血液製品の高感度かつ選択的なスクリーニング法ならびにH C V を培養するための改良された方法が必要である。動物またはインビトロ法において、あるいはその天然宿主においてウイルスを検出できる新たな抗体は、有効な診断ツールおよび治療薬の設計を促進する可能性がある。この点において、本発明は、種々の組織または細胞におけるH C V抗原の検出に使用できる、E 1 またはE 2 - H V R に対して指向されたモノクローナル抗体に関する驚くべき知見に基づく。これらの組織は肝臓のみならず、血液試料由来の細胞も包含する。それゆえ、本発明は、E 1 蛋白の主要部分 (C末端) 、およびE 2 蛋白のN末端領域をカバーするH C V エンベロープ蛋白領域 a a 2 2 7 - 4 5 0 に特異的に結合する抗体の提供および使用を目的とする。これらの抗体は天然H C V蛋白抗原の検出を可能にし、天然H C V蛋白抗原検出キットの製造に使用できる。完全なE 1 蛋白が a a 1 9 2 - 3 8 3 に対応し、完全なE 2 蛋白が a a 3 8 4 - 7 4 7 に対応することが明らかとなっている (Major and Feinstone, 1997; Maertens and Stuyver, 1997参照)。

【0010】

より詳細には、本発明は、以下のエピトープ：

HCV E1蛋白のaa307-326 (配列番号：30)

HCV E2蛋白のaa395-415 (配列番号：31)

の少なくとも1つに特異的に結合する、上で定義した抗体の提供および使用を目的とする。

【0011】

そのうえ、本発明は、モノクローナル抗体である上で定義した抗体の提供および使用を目的とする。この点において、本発明は、受託番号98031215または98031214としてECAACCに寄託されたハイブリドーマにより分泌されるモノクローナル抗体の提供および使用を目的とする。

【0012】

本発明は、上で定義した抗体の機能的に等価な変種またはフラグメント、ならびにそれらの変異体、あるいは配列番号：30および31との同様の反応性を示す分子（ファージまたは他のライプラリーから得られるような）の提供および使用を目的とする。

さらに、本発明は、HCV蛋白抗原の検出を可能にし、天然HCV蛋白抗原検出キットの製造に使用できる、HCV E1蛋白（aa227-383）またはHCV E2 N末端超可変領域（aa384-450）に特異的に結合するモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマ細胞系の提供および使用を目的とする。より詳細には、本発明は、受託番号98031215または98031214を有するECAACC寄託物に対応するハイブリドーマ細胞系の提供および使用を目的とする。

【0013】

さらにそのうえ、本発明は、天然HCV蛋白抗原の検出方法を提供し、該方法は、

HCV蛋白抗原を含む可能性のある試験試料を、上で定義した抗体または該抗体の機能的に等価な変種もしくはフラグメントと接触させて抗体-抗原複合体を形成させ、次いで、

該抗原-抗体複合体を適當なマーカーを用いて調べる
ことを含む。

【0014】

より詳細には、本発明は、上で定義した方法であって、該試験試料が末梢血液細胞のごときヒト細胞、または肝臓組織のごときヒト組織を含むものである方法を提供することを目的とする。

【0015】

最後に、本発明は、天然HCV蛋白抗原を検出するためのアッセイキットの提供を目的とし、該キットは

上で定義した抗体、または該抗体の機能的に等価な変種もしくはフラグメント、および

試験試料中のHCV蛋白抗原と該抗体または該抗体の機能的に等価な変種もしくはフラグメントとの間に形成される複合体を調べることのできる適當なマーカー

を含む。

本発明のすべての目的は、後で示す具体例に合致したものと考えられる。

【0016】

表の簡単な説明

表1は、本願のすべてのペプチドの配列を示す。

表2は、E2中の超可変ドメインの種々の配列に対するIGH222の交差反応性を示す。すべてのペプチドをビオチン化し、ストレプトアビシン被覆マイクロタイタープレートに結合し、IGH222と反応させた。

【0017】

発明の詳細な説明

本明細書記載の本発明は、すでに公表された研究および係属中の特許出願に源を発するものである。例えば、かかる研究は科学文献、特許または係属中の特許出願からなる。すでに引用され、あるいは以下に引用されるこれらの刊行物および出願のすべてを、参照により本明細書に一体化させる。

【0018】

ウイルス蛋白に特異的に結合し、天然HCV蛋白抗原（すなわち、HCV感染後に宿主により発現される蛋白抗原）を認識できる抗体の欠如によりウイルス蛋白の検出が妨げられてきたことは明らかである。本発明は、HCVエンベロープ蛋白上の2つの新たなエピトープを見出したことに基づくものであり、これらのエピトープに対して指向された抗体を用いることにより、それらは宿主由来の生物学的試料中の天然HCV蛋白抗原を常套的に検出することを可能にするものである。よって、本発明は、天然HCV蛋白検出キットの製造のためのHCV E 1蛋白のC末端領域（aa 227-383）またはHCV E 2蛋白のN末端領域（aa 384-450）に特異的に結合する抗体の使用に関する。用語「HCV E 1蛋白のC末端領域（aa 227-383）またはHCV E 2蛋白のN末端領域（aa 384-450）に特異的に結合する抗体」は、C型肝炎ウイルス粒子または該ウイルス粒子由来の分子に、より詳細にはE 1蛋白のC末端領域およびE 2蛋白のN末端領域に結合するポリクローナルまたはモノクローナル抗体をいう。HCVウイルスの「エンベロープ領域」、および「HCV E 1蛋白のC末端領域（aa 227-383）またはHCV E 2蛋白のN末端領域（aa 384-450）」は当業者によく知られた領域である（Wengler, 1991; Major and Feistone, 1997; Maertens and Stuyver, 1997）。

【0019】

用語「結合」は、本発明抗体が物理的にHCV蛋白に連結されることを示す。詳細には、抗体がHCVエンベロープ蛋白に特異的に結合することを示し、HCVの他の成分または他の蛋白との交差反応が実質的ないことを意味する。結合、ELISAおよびRIA型のアッセイまたは競合アッセイのごとき当該分野で知られた方法またはアッセイキットにより、HCV蛋白への抗体の結合を示すことができる（例えば、*Current protocols in immunology*参照）。抗体に結合するHCVエンベロープ蛋白の領域は連続した配列から構成されている必要はないことが明らかなはずである。

【0020】

本明細書の用語「モノクローナル抗体」は、均一な抗体集団を有する抗体組成物をいう。該用語は抗体の種または起源を限定するものではなく、作成方法によ

り限定されるものでもない。さらに、用語「抗体」は、免疫グロブリンのフレームワーク領域の少なくとも一部分がヒト免疫グロブリン配列に由来するヒト化抗体および米国特許第4946778号に記載されたような1本鎖抗体ならびに元の抗体の抗原結合機能および特異性を保持しているF_{ab}、F_{c(ab)2}、F_vおよび他のフラグメントのごとき抗体フラグメントをいう。Lorreらの欧州特許出願第97870092.0に記載されたような、元の抗体の抗原結合機能および特異性を保持している2価抗体、3価抗体、4価抗体も用語「抗体」に含まれる。本発明の抗体は天然HCV蛋白抗原の検出方法において使用できることが明らかなるはずである。

【0021】

用語「試験試料」は、血清、血漿、唾液、粘膜、脊髄液または生検のごとき宿主から得られた試料をいう。この点において、用語「試験試料」および「生物学的試料」を混用する。用語「生検」は、特に、細胞含有試料、とりわけヒト細胞含有試料をいう。そのうえ、後者の用語は末梢血細胞のごとき液体組織由来の試料、あるいは肝臓組織のごとき個体組織由来の試料もいう。生検に基づいて抗原検出を行う場合、用語「*in situ*検出」を使用する。

【0022】

用語「天然HCV蛋白抗原検出キット」は、当業者に知られたいずれかの方法によりHCV蛋白抗原の検出、好ましくはHCV E1蛋白のC末端領域(aa227-383)またはHCV E2蛋白のN末端領域(aa384-450)のそれらの天然または元の位置での検出、好ましくは試験試料中に存在する抗原の検出を行うためのキットをいう。他の場合において、この用語は、本発明の抗体の結合によりHCV E1蛋白のC末端領域(aa227-383)またはHCV E2蛋白のN末端領域(aa384-450)のそれらの天然宿主または組織における存在を可視化することをいう。検出キットは以下の成分を含む：

- (i) 適当な場合には、試験試料の単離手段
- (ii) 可能ならば、細胞を透過性にする溶液
- (iii) 本明細書記載の抗体、あるいはその機能的に等価な変種またはフラグメント

(i v) 可能ならば、二次抗体および三次抗体、

(v) 可能ならば、インキュベーションおよび／または洗浄バッファー、

(v i) 可能ならば、染色溶液。

好ましくは、HCVエンベロープ蛋白の*in situ*での検出に該キットを使用する。

【0023】

天然宿主細胞または組織は、いずれの宿主細胞またはいずれの宿主種由来の組織であってもよい。特に、天然宿主細胞は末梢血細胞をいい、天然組織は肝臓組織をいう（本明細書の実施例の部分参照）。天然宿主は、とりわけ、ヒトをいうが、非ヒト靈長類または他の哺乳動物をいうこともある。

より詳細には、本発明は、下記エピトープ：HCV E 1 蛋白の aa 307-326 および HCV E 2 蛋白の aa 395-415 の少なくとも 1 種に特異的に結合する抗体に関する。これらの抗体は、the European Collection of Cell Cultures (ECACC), Centre for Applied Microbiology & Research, Salisbury, Wiltshire SP4 0JG, U.K. (Tel: +44 1980 612512; fax: +44 1980 611315) に 1998 年 3 月 13 日に寄託され、以下の受託番号：98031215 [（エピトープ aa 395-415（配列番号：31）に結合する mA bIGH 222 を分泌するハイブリドーマ 17H10F4D10 に関する）] ならびに 98031214 [（エピトープ aa 307-326（配列番号：30）に結合する mA bIGH 207 を分泌するハイブリドーマ 14H11B2 に関する）] を付与されたハイブリドーマにより分泌される。この点において、該エピトープの部分に結合する抗体も本発明の一部であることが明らかなはずである。例えば、それゆえ、下記エピトープ：

aa307-311, aa308-312, aa309-313, aa310-314, aa311-315, aa312-316, aa312-317, aa313-318, aa314-319, aa315-320, aa316-321, aa317-322, aa318-323, aa319-324, aa320-325, aa321-326, aa307-312, aa308-313, aa309-314, aa310-315, aa311-316, aa312-317, aa313-318, aa314-319, aa315-320, aa316-321, aa317-322, aa318-323, aa319-324, aa320-325, aa321-326, aa307-313, aa308-314, aa309-315, aa310-316, aa311-317, aa312-318, aa313-319, aa314-320, aa315-321, aa316-322, aa317-323, aa318-324, aa319-325, aa320-326, aa321-327, aa322-328, aa323-329, aa324-330, aa325-331, aa326-332, aa327-333, aa328-334, aa329-335, aa320-336, aa321-337, aa322-338, aa323-339, aa324-340, aa325-341, aa326-342, aa327-343, aa328-344, aa329-345, aa320-346, aa321-347, aa322-348, aa323-349, aa324-350, aa325-351, aa326-352, aa327-353, aa328-354, aa329-355, aa320-356, aa321-357, aa322-358, aa323-359, aa324-360, aa325-361, aa326-362, aa327-363, aa328-364, aa329-365, aa320-366, aa321-367, aa322-368, aa323-369, aa324-370, aa325-371, aa326-372, aa327-373, aa328-374, aa329-375, aa320-376, aa321-377, aa322-378, aa323-379, aa324-380, aa325-381, aa326-382, aa327-383, aa328-384, aa329-385, aa320-386, aa321-387, aa322-388, aa323-389, aa324-390, aa325-391, aa326-392, aa327-393, aa328-394, aa329-395, aa320-396, aa321-397, aa322-398, aa323-399, aa324-400, aa325-401, aa326-402, aa327-403, aa328-404, aa329-405, aa320-406, aa321-407, aa322-408, aa323-409, aa324-410, aa325-411, aa326-412, aa327-413, aa328-414, aa329-415, aa320-416, aa321-417, aa322-418, aa323-419, aa324-420, aa325-421, aa326-422, aa327-423, aa328-424, aa329-425, aa320-426, aa321-427, aa322-428, aa323-429, aa324-430, aa325-431, aa326-432, aa327-433, aa328-434, aa329-435, aa320-436, aa321-437, aa322-438, aa323-439, aa324-440, aa325-441, aa326-442, aa327-443, aa328-444, aa329-445, aa320-446, aa321-447, aa322-448, aa323-449, aa324-450, aa325-451, aa326-452, aa327-453, aa328-454, aa329-455, aa320-456, aa321-457, aa322-458, aa323-459, aa324-460, aa325-461, aa326-462, aa327-463, aa328-464, aa329-465, aa320-466, aa321-467, aa322-468, aa323-469, aa324-470, aa325-471, aa326-472, aa327-473, aa328-474, aa329-475, aa320-476, aa321-477, aa322-478, aa323-479, aa324-480, aa325-481, aa326-482, aa327-483, aa328-484, aa329-485, aa320-486, aa321-487, aa322-488, aa323-489, aa324-490, aa325-491, aa326-492, aa327-493, aa328-494, aa329-495, aa320-496, aa321-497, aa322-498, aa323-499, aa324-500, aa325-501, aa326-502, aa327-503, aa328-504, aa329-505, aa320-506, aa321-507, aa322-508, aa323-509, aa324-510, aa325-511, aa326-512, aa327-513, aa328-514, aa329-515, aa320-516, aa321-517, aa322-518, aa323-519, aa324-520, aa325-521, aa326-522, aa327-523, aa328-524, aa329-525, aa320-526, aa321-527, aa322-528, aa323-529, aa324-530, aa325-531, aa326-532, aa327-533, aa328-534, aa329-535, aa320-536, aa321-537, aa322-538, aa323-539, aa324-540, aa325-541, aa326-542, aa327-543, aa328-544, aa329-545, aa320-546, aa321-547, aa322-548, aa323-549, aa324-550, aa325-551, aa326-552, aa327-553, aa328-554, aa329-555, aa320-556, aa321-557, aa322-558, aa323-559, aa324-560, aa325-561, aa326-562, aa327-563, aa328-564, aa329-565, aa320-566, aa321-567, aa322-568, aa323-569, aa324-570, aa325-571, aa326-572, aa327-573, aa328-574, aa329-575, aa320-576, aa321-577, aa322-578, aa323-579, aa324-580, aa325-581, aa326-582, aa327-583, aa328-584, aa329-585, aa320-586, aa321-587, aa322-588, aa323-589, aa324-590, aa325-591, aa326-592, aa327-593, aa328-594, aa329-595, aa320-596, aa321-597, aa322-598, aa323-599, aa324-600, aa325-601, aa326-602, aa327-603, aa328-604, aa329-605, aa320-606, aa321-607, aa322-608, aa323-609, aa324-610, aa325-611, aa326-612, aa327-613, aa328-614, aa329-615, aa320-616, aa321-617, aa322-618, aa323-619, aa324-620, aa325-621, aa326-622, aa327-623, aa328-624, aa329-625, aa320-626, aa321-627, aa322-628, aa323-629, aa324-630, aa325-631, aa326-632, aa327-633, aa328-634, aa329-635, aa320-636, aa321-637, aa322-638, aa323-639, aa324-640, aa325-641, aa326-642, aa327-643, aa328-644, aa329-645, aa320-646, aa321-647, aa322-648, aa323-649, aa324-650, aa325-651, aa326-652, aa327-653, aa328-654, aa329-655, aa320-656, aa321-657, aa322-658, aa323-659, aa324-660, aa325-661, aa326-662, aa327-663, aa328-664, aa329-665, aa320-666, aa321-667, aa322-668, aa323-669, aa324-670, aa325-671, aa326-672, aa327-673, aa328-674, aa329-675, aa320-676, aa321-677, aa322-678, aa323-679, aa324-680, aa325-681, aa326-682, aa327-683, aa328-684, aa329-685, aa320-686, aa321-687, aa322-688, aa323-689, aa324-690, aa325-691, aa326-692, aa327-693, aa328-694, aa329-695, aa320-696, aa321-697, aa322-698, aa323-699, aa324-700, aa325-701, aa326-702, aa327-703, aa328-704, aa329-705, aa320-706, aa321-707, aa322-708, aa323-709, aa324-710, aa325-711, aa326-712, aa327-713, aa328-714, aa329-715, aa320-716, aa321-717, aa322-718, aa323-719, aa324-720, aa325-721, aa326-722, aa327-723, aa328-724, aa329-725, aa320-726, aa321-727, aa322-728, aa323-729, aa324-730, aa325-731, aa326-732, aa327-733, aa328-734, aa329-735, aa320-736, aa321-737, aa322-738, aa323-739, aa324-740, aa325-741, aa326-742, aa327-743, aa328-744, aa329-745, aa320-746, aa321-747, aa322-748, aa323-749, aa324-750, aa325-751, aa326-752, aa327-753, aa328-754, aa329-755, aa320-756, aa321-757, aa322-758, aa323-759, aa324-760, aa325-761, aa326-762, aa327-763, aa328-764, aa329-765, aa320-766, aa321-767, aa322-768, aa323-769, aa324-770, aa325-771, aa326-772, aa327-773, aa328-774, aa329-775, aa320-776, aa321-777, aa322-778, aa323-779, aa324-780, aa325-781, aa326-782, aa327-783, aa328-784, aa329-785, aa320-786, aa321-787, aa322-788, aa323-789, aa324-790, aa325-791, aa326-792, aa327-793, aa328-794, aa329-795, aa320-796, aa321-797, aa322-798, aa323-799, aa324-800, aa325-801, aa326-802, aa327-803, aa328-804, aa329-805, aa320-806, aa321-807, aa322-808, aa323-809, aa324-810, aa325-811, aa326-812, aa327-813, aa328-814, aa329-815, aa320-816, aa321-817, aa322-818, aa323-819, aa324-820, aa325-821, aa326-822, aa327-823, aa328-824, aa329-825, aa320-826, aa321-827, aa322-828, aa323-829, aa324-830, aa325-831, aa326-832, aa327-833, aa328-834, aa329-835, aa320-836, aa321-837, aa322-838, aa323-839, aa324-840, aa325-841, aa326-842, aa327-843, aa328-844, aa329-845, aa320-846, aa321-847, aa322-848, aa323-849, aa324-850, aa325-851, aa326-852, aa327-853, aa328-854, aa329-855, aa320-856, aa321-857, aa322-858, aa323-859, aa324-860, aa325-861, aa326-862, aa327-863, aa328-864, aa329-865, aa320-866, aa321-867, aa322-868, aa323-869, aa324-870, aa325-871, aa326-872, aa327-873, aa328-874, aa329-875, aa320-876, aa321-877, aa322-878, aa323-879, aa324-880, aa325-881, aa326-882, aa327-883, aa328-884, aa329-885, aa320-886, aa321-887, aa322-888, aa323-889, aa324-890, aa325-891, aa326-892, aa327-893, aa328-894, aa329-895, aa320-896, aa321-897, aa322-898, aa323-899, aa324-900, aa325-901, aa326-902, aa327-903, aa328-904, aa329-905, aa320-906, aa321-907, aa322-908, aa323-909, aa324-910, aa325-911, aa326-912, aa327-913, aa328-914, aa329-915, aa320-916, aa321-917, aa322-918, aa323-919, aa324-920, aa325-921, aa326-922, aa327-923, aa328-924, aa329-925, aa320-926, aa321-927, aa322-928, aa323-929, aa324-930, aa325-931, aa326-932, aa327-933, aa328-934, aa329-935, aa320-936, aa321-937, aa322-938, aa323-939, aa324-940, aa325-941, aa326-942, aa327-943, aa328-944, aa329-945, aa320-946, aa321-947, aa322-948, aa323-949, aa324-950, aa325-951, aa326-952, aa327-953, aa328-954, aa329-955, aa320-956, aa321-957, aa322-958, aa323-959, aa324-960, aa325-961, aa326-962, aa327-963, aa328-964, aa329-965, aa320-966, aa321-967, aa322-968, aa323-969, aa324-970, aa325-971, aa326-972, aa327-973, aa328-974, aa329-975, aa320-976, aa321-977, aa322-978, aa323-979, aa324-980, aa325-981, aa326-982, aa327-983, aa328-984, aa329-985, aa320-986, aa321-987, aa322-988, aa323-989, aa324-990, aa325-991, aa326-992, aa327-993, aa328-994, aa329-995, aa320-996, aa321-997, aa322-998, aa323-999, aa324-1000, aa325-1001, aa326-1002, aa327-1003, aa328-1004, aa329-1005, aa320-1006, aa321-1007, aa322-1008, aa323-1009, aa324-1010, aa325-1011, aa326-1012, aa327-1013, aa328-1014, aa329-1015, aa320-1016, aa321-1017, aa322-1018, aa323-1019, aa324-1020, aa325-1021, aa326-1022, aa327-1023, aa328-1024, aa329-1025, aa320-1026, aa321-1027, aa322-1028, aa323-1029, aa324-1030, aa325-1031, aa326-1032, aa327-1033, aa328-1034, aa329-1035, aa320-1036, aa321-1037, aa322-1038, aa323-1039, aa324-1040, aa325-1041, aa326-1042, aa327-1043, aa328-1044, aa329-1045, aa320-1046, aa321-1047, aa322-1048, aa323-1049, aa324-1050, aa325-1051, aa326-1052, aa327-1053, aa328-1054, aa329-1055, aa320-1056, aa321-1057, aa322-1058, aa323-1059, aa324-1060, aa325-1061, aa326-1062, aa327-1063, aa328-1064, aa329-1065, aa320-1066, aa321-1067, aa322-1068, aa323-1069, aa324-1070, aa325-1071, aa326-1072, aa327-1073, aa328-1074, aa329-1075, aa320-1076, aa321-1077, aa322-1078, aa323-1079, aa324-1080, aa325-1081, aa326-1082, aa327-1083, aa328-1084, aa329-1085, aa320-1086, aa321-1087, aa322-1088, aa323-1089, aa324-1090, aa325-1091, aa326-1092, aa327-1093, aa328-1094, aa329-1095, aa320-1096, aa321-1097, aa322-1098, aa323-1099, aa324-1100, aa325-1101, aa326-1102, aa327-1103, aa328-1104, aa329-1105, aa320-1106, aa321-1107, aa322-1108, aa323-1109, aa324-1110, aa325-1111, aa326-1112, aa327-1113, aa328-1114, aa329-1115, aa320-1116, aa321-1117, aa322-1118, aa323-1119, aa324-1120, aa325-1121, aa326-1122, aa327-1123, aa328-1124, aa329-1125, aa320-1126, aa321-1127, aa322-1128, aa323-1129, aa324-1130, aa325-1131, aa326-1132, aa327-1133, aa328-1134, aa329-1135, aa320-1136, aa321-1137, aa322-1138, aa323-1139, aa324-1140, aa325-1141, aa326-1142, aa327-1143, aa328-1144, aa329-1145, aa320-1146, aa321-1147, aa322-1148, aa323-1149, aa324-1150, aa325-1151, aa326-1152, aa327-1153, aa328-1154, aa329-1155, aa320-1156, aa321-1157, aa322-1158, aa323-1159, aa324-1160, aa325-1161, aa326-1162, aa327-1163, aa328-1164, aa329-1165, aa320-1166, aa321-1167, aa322-1168, aa323-1169, aa324-1170, aa325-1171, aa326-1172, aa327-1173, aa328-1174, aa329-1175, aa320-1176, aa321-1177, aa322-1178, aa323-1179, aa324-1180, aa325-1181, aa326-1182, aa327-1183, aa328-1184, aa329-1185, aa320-1186, aa321-1187, aa322-1188, aa323-1189, aa324-1190, aa325-1191, aa326-1192, aa327-1193, aa328-1194, aa329-1195, aa320-1196, aa321-1197, aa322-1198, aa323-1199, aa324-1200, aa325-1201, aa326-1202, aa327-1203, aa328-1204, aa329-1205, aa320-1206, aa321-1207, aa322-1208, aa323-1209, aa324-1210, aa325-1211, aa326-1212, aa327-1213, aa328-1214, aa329-1215, aa320-1216, aa321-1217, aa322-1218, aa323-1219, aa324-1220, aa325-1221, aa326-1222, aa327-1223, aa328-1224, aa329-1225, aa320-1226, aa321-1227, aa322-1228, aa323-1229, aa324-1230, aa325-1231, aa326-1232, aa327-1233, aa328-1234, aa329-1235, aa320-1236, aa321-1237, aa322-1238, aa323-1239, aa324-1240, aa325-1241, aa326-1242, aa327-1243, aa328-1244, aa329-1245, aa320-1246, aa321-1247, aa322-1248, aa323-1249, aa324-1250, aa325-1251, aa326-1252, aa327-1253, aa328-1254, aa329-1255, aa320-1256, aa321-1257, aa322-1258, aa323-1259, aa324-1260, aa325-1261, aa326-1262, aa327-1263, aa328-1264, aa329-1265, aa320-1266, aa321-1267, aa322-1268, aa323-1269, aa324-1270, aa325-1271, aa326-1272, aa327-1273, aa328-1274, aa329-1275, aa320-1276, aa321-1277, aa322-1278, aa323-1279, aa324-1280, aa325-1281, aa326-1282, aa327-1283, aa328-1284, aa329-1285, aa320-1286, aa321-1287, aa322-1288, aa323-1289, aa324-1290, aa325-1291, aa326-1292, aa327-1293, aa328-1294, aa329-1295, aa320-1296, aa321-1297, aa322-1298, aa323-1299, aa324-1300, aa325-1301, aa326-1302, aa327-1303, aa328-1304, aa329-1305, aa320-1306, aa321-1307, aa322-1308, aa323-1309, aa324-1310, aa325-1311, aa326-1312, aa327-1313, aa328-1314, aa329-1315, aa320-1316, aa321-1317, aa322-1318, aa323-1319, aa324-1320, aa325-1321, aa326-1322, aa327-1323, aa328-1324, aa329-1325, aa320-1326, aa321-1327, aa322-1328, aa323-1329, aa324-1330, aa325-1331, aa326-1332, aa327-1333, aa328-1334, aa329-1335, aa320-1336, aa321-1337, aa322-1338, aa323-1339, aa324-1340, aa325-1341, aa326-1342, aa327-1343, aa328-1344, aa329-1345, aa320-1346, aa321-1347, aa322-1348, aa323-1349, aa324-1350, aa325-1351, aa326-1352, aa327-1353, aa328-1354, aa329-1355, aa320-1356, aa321-1357, aa322-1358, aa323-1359, aa324-1360, aa325-1361, aa326-1362, aa327-1363, aa328-1364, aa329-1365, aa320-1366, aa321-1367, aa322-1368, aa323-1369, aa324-1370, aa325-1371, aa326-1372, aa327-1373, aa328-1374, aa329-1375, aa320-1376, aa321-1377, aa322-1378, aa323-1379, aa324-1380, aa325-1381, aa326-1382, aa327-1383, aa328-1384, aa329-1385, aa320-1386, aa321-1387, aa322-1388, aa323-1389, aa324-1390, aa325-1391, aa326-1392, aa327-1393, aa328-1394, aa329-1395, aa320-1396, aa321-1397, aa322-1398, aa323-1399, aa324-1400, aa325-1401, aa326-1402, aa327-1403, aa328-1404, aa329-1405, aa320-1406, aa321-1407, aa322-1408, aa323-1409, aa324-1410, aa325-1411, aa326-1412, aa327-1413, aa328-1414, aa329-1415, aa320-1416, aa321-1417, aa322-1418, aa323-1419, aa324-1420, aa325-1421, aa326-1422, aa327-1423, aa328-1424, aa329-1425, aa320-1426, aa321-1427, aa322-1428, aa323-1429, aa324-1430, aa325-1431, aa326-1432, aa327-1433, aa328-1434, aa329-1435, aa320-1436, aa321-1437, aa322-1438, aa323-1439, aa324-1440, aa325-1441, aa326-1442, aa327-1443, aa328-1444, aa329-1445, aa320-1446, aa321-1447, aa322-1448, aa323-1449, aa324-1450, aa325-1451, aa326-1452, aa327-1453, aa328-1454, aa329-1455, aa320-1456, aa321-1457, aa322-1458, aa323-1459, aa324-1460, aa325-1461, aa326-1462, aa327-1463, aa328-1464, aa329-1465, aa320-1466, aa321-1467, aa322-1468, aa323-1469, aa324-1470, aa325-1471, aa326-1472, aa327-1473, aa328-1474, aa329-1475, aa320-1476, aa321-1477, aa322-1478, aa323-1479, aa324-1480, aa325-1481, aa326-1482, aa327-1483, aa328-1484, aa329-1485, aa320-1486, aa321-1487, aa322-1488, aa323-1489, aa324-1490, aa325-1491, aa326-1492, aa327-1493, aa328-1494, aa329-1495, aa320-1496, aa321-1497, aa322-1498, aa323-1499, aa324-1500, aa325-1501, aa326-1502, aa327-15

407, aa399-408, aa400-409, aa401-410, aa402-411, aa403-412, aa404-413, a
a405-414, aa406-415, aa395-405, aa396-406, aa397-407, aa398-408, aa399-4
09, aa400-410, aa401-411, aa402-412, aa403-413, aa404-414, aa405-415, aa
395-406, aa396-407, aa397-408, aa398-409, aa399-410, aa400-411, aa401-41
2, aa402-413, aa403-414, aa404-415, aa395-407, aa396-408, aa397-409, aa3
98-410, aa399-411, aa400-412, aa401-413, aa402-414, aa403-415, aa395-408
, aa396-409, aa397-410, aa398-411, aa399-412, aa400-413, aa401-414, aa40
2-415, aa395-409, aa396-410, aa397-411, aa398-412, aa399-413, aa400-414,
aa401-415, aa395-410, aa396-411, aa397-412, aa398-413, aa399-414, aa40
0-415, aa395-411, aa396-412, aa397-413, aa398-414, aa399-415, aa395-412
, aa396-413, aa397-414, aa398-415, aa395-413, aa396-414, aa397-415, aa3
95-414 および 396-415

に結合する抗体も包含される。

【0024】

また本発明は、上記抗体の機能的に等価な変種もしくはフラグメントにも関する。用語「機能的に等価な変種もしくはフラグメント」は、元の抗体の抗原結合機能および特異性を保持している、該抗体の当該分野で知られた変種もしくはフラグメントをいう。

【0025】

より詳細には、この用語は、上記のごとく定義されたヒト化抗体および1本鎖抗体ならびにF_{ab}、F_{c(ab)2}、F_v等のごとき抗体フラグメントをいう。上記のような2価抗体、3価抗体および4価抗体ならびにそれらの変異形態あるいはLandner, 1995; Maclellanman, 1995およびCannon et al., 1996により記載されたファージまたは他のライブライマーから得られるような配列番号: 30 および 31 に対して類似の機能的結合反応性を示す分子をいう。実際、これらの著者らにより記載されたペプチドは天然のHCV蛋白抗原の検出を可能にするものであり、本発明の一部である。

【0026】

また本発明は、上で定義した抗体を分泌するハイブリドーマ細胞系に関する。

この点において、本質的にはKohler and Milstein (1975)に準じたm A bを得るためのハイブリドーマ法が当業者によく知られていることは明らかはずである。m A bが特異的に結合するエピトープのマッピングを、DeplaらのP C T/E P 9 7 / 0 7 2 6 8 に記載された方法のごとき当該分野で知られた方法により行なうことができる。

【0027】

また本発明は、天然HCV蛋白抗原の検出方法にも関し、該方法は、

HCV蛋白抗原を含む可能性のある試験試料を、上で定義した抗体または該抗体の機能的に等価な変種もしくはフラグメントと接触させて抗体-抗原複合体を形成させ、次いで、

該抗原-抗体複合体を適当なマーカーを用いて調べることを含む。

好ましくは、該方法を、*in situ*でのHCVエンベロープ蛋白の検出に使用する。

【0028】

用語「該抗体-抗原複合体を適当なマーカーを用いて調べる」は、上記抗原-抗体複合体を検出または可視化する、蛍光フローサイトメトリー、結合、ELISAおよびRIA型アッセイまたは競合アッセイのごとき当該分野で知られた方法をいう（実施例の部分、Hertogs et al., 1993、およびMehta et alのW093/04084参照）。同様に、用語「適当なマーカー」は、Mehta et alのW093/04084およびColigan et al., 1992に記載のマーカーのごとき当該分野で知られたマーカーであって、上記抗原-抗体複合体を可視化させるものをいう。

【0029】

この点において、本発明は、天然HCV蛋白抗原を検出するためのアッセイキットにも関し、該キットは、上で定義した抗体、または該抗体の機能的に等価な変種もしくはフラグメント、および試験試料中のHCV蛋白と該抗体または該抗体の機能的に等価な変種もしくはフラグメントとの間に形成された複合体を調べることを可能にする適当なマーカーを含む。

【0030】

特に有利な具体例を示す下記実施例を参照することにより本発明を説明する。
しかしながら、これらの具体例は単なる説明であって、本発明を限定するものと解してはならない。

【0031】

実施例

実施例1：E1およびE2に対するモノクローナル抗体の取得

MaertensらのPCT/EP95/03031に記載されたように、組み換えワクシニアウイルスにより発現されたE1の末端切断バージョン（aa192-326）およびE2の末端切断バージョン（aa384-673）でマウスを免疫した。免疫後、マウスの脾臓細胞をミエローマ細胞系と融合させた。E1またはE2に対して特異的な抗体を分泌するハイブリドーマをELISAにより選択した。

【0032】

実施例2：モノクローナル抗体の選択

E1またはE2に対して指向された広範なモノクローナル抗体（全部で25種、そのうち14種について詳細を調べた；これら14種はInnogenetics NV, Gent, Belgiumから得た）を、HCV患者の肝臓生検および対照（下記参照）において天然HCV抗原の染色に関して評価した。凍結切片またはホルムアルデヒド固定生検のいずれかに対して染色を行った（プロトコールに関しては、図面のリジエンド参照）。3つのモノクローナル抗体のみが明確かつ特異的な染色を示した。他のすべてのモノクローナル抗体は染色を示さないかまたは弱い染色を示し、あるいは非特異的染色を示した。2種の異なる抗原染色パターンが明確に観察された。E2に指向されたモノクローナル抗体IGH222は肝細胞を明確に染色したが（図1）、E1に指向されたIGH207およびIGH210は肝臓中に浸潤したリンパ球を染色した（図2aおよび2b）。IGH207は肝細胞も染色したが、IGH222よりも程度が弱かった（図1と2aとを比較）。この染色パターンは、5人の異なる患者の一連の生検により確認された。

モノクローナル エンベロープ 染色パターン

IGH 200

E1

陰性

IGH 201	E1	弱い
IGH 202	E1	陰性
IGH 204	E1	弱い
IGH 207	E1	リンパ球に対して強い陽性、肝細胞に 対して弱い陽性
IGH 209	E1	陰性
IGH 210	E1	リンパ球に対して陽性（ホルムアルデヒド 固定後にのみ観察された）
IGH 212	E2	弱い
IGH 214	E2	陰性
IGH 215	E2	陰性
IGH 216	E2	陰性
IGH 219	E2	陰性
IGH 221	E2	陰性
IGH 222	E2	肝細胞に対して強い陽性

【0033】

実施例3：末梢血細胞中のウイルスエンベロープ抗原の検出を可能にするモノクローナル抗体の同定

肝臓中のリンパ球浸潤物をHCVエンベロープ抗原に関して染色できたという知見を得たので、末梢血单核細胞についても調べることにした。細胞内染色を可能にするために、末梢血細胞をサボニンで透過性にし、その後、モノクローナル抗体IGH 201または207（E1に指向され、それぞれ、肝臓生検に対して弱い陽性および強い陽性を示す）と反応させた。最後に、二次FITC-標識抗体を用いる蛍光セルソーターで反応性をチェックした。肝臓中のリンパ球浸潤物をすでに染色しているIGH 207は高い特異性を示した。このモノクローナル抗体を用いると、バックグラウンド染色はほとんど検出されず、5人のうち4人の患者が明確に陽性染色となった（図3）。やはりE1に指向された第2のモノクローナル抗体IGH 201（配列番号：29に結合する；ECACC受託番号：98031216）は高いバックグラウンドを生じたが、図4に示す様

グラフからわかるように5人の患者のうち5人において細胞内E 1が検出され、対照試料と比較して蛍光強度の強い細胞の明確な下位集団が示された。

【0034】

実施例4：E 1またはE 2に対する反応性モノクローナル抗体のマッピング

抗体を生じさせたE 1およびE 2蛋白をスキャンするペプチドを用いて、全部で14種のモノクローナル抗体をそれぞれのエピトープにマッピングした。これらのペプチドはビオチン化され、ストレプトアビシン結合マイクロタイターブレートに結合させ、次いで、モノクローナル抗体と反応させた。陽性対照として、組み換えエンベロープ蛋白をチェックした。

各モノクローナル抗体について、2つの重複ペプチドにより画定される特異的エピトープ領域に対する反応性を決定した（配列の詳細については表I参照）。

ペプチド	aa 領域	反応性モノクローナル
V1V2	192-226	IGH 201, 204, 202, 200
V2V3	212-244	IGH 201, 204, 202, 200
V3V4	230-263	
HR	261-290	
V5C4	288-327	IGH 207, 210, 209
C4V6	307-340	IGH 207, 210, 209
組換え型	192-326	IGH 201, 207, 210, 204, 202, 200, 209
HVR I	384-415	IGH 222, 215
HVR1/C1a	395-428	IGH 222, 215
C1a	413-447	
C1b	430-467	
HVR II	460-487	IGH 212, 214, 221
C2a	480-513	IGH 219, 216
C2b	500-530	
V3-C3	523-566	
V4	561-590	
C4a	578-627	

C4b	621-648
C4c	641-673
組換え型	384-673

IGH 201に対するエピトープを、領域212-226（配列番号：29）と決定することができ、IGH 210に対しては307-326（配列番号：30）と、IGH 222に対しては395-415（配列番号：31）と決定できる。IGH 201のアミノ酸領域はむしろHCVのE1蛋白の可変領域であり、HCVのin situ検出に関連してすでに報告されている（Hiramatsu et al., 1992, Kaito et al., 1994）。しかしながら、我々の研究によれば、この抗体での肝臓生検染色が陰性であり、末梢血リンパ球に対する染色がかなりのバックグラウンドを示したので、このエピトープに指向された抗体はHCVのin situ検出にはむしろ不適であることが明らかである。対照的に、IGH 207およびIGH 210はE1の完全に保存された領域（Maertens and Stuyver, 1997）を認識する。モノクローナル抗体IGH 222は、E2のN末端超可変ドメインの部分であるE2の一領域を認識し、HCVのin situ検出に非常に適していることがわかった。

【0035】

実施例5：可変のエピトープに対する交差反応性の決定

E2の種々のN末端超可変エピトープの配列に由来するさらなるシリーズのペプチドを用いて、IGH 222をさらに特徴づけた。表2はこれらの実験をまとめたものである。この表から、このモノクローナル抗体は数種の配列と反応するが、他のいくつかのものとは反応しないと結論できる。IGH 222により認識されない他の配列に対してより良い反応性を持った、このエピトープに対するさらなる抗体を当業者が得るには、このエピトープで十分であることがわかる。かかる配列は、例えば、#490、940、884、484および494のペプチドであるが、a a 395-415間の領域にある他の配列に対してはIGH 222が反応しない可能性があることがわかる。

【0036】

これらの実施例から、モノクローナル抗体IGH 201、207、210お

より222により認識されるエピトープは結合抗体が容易に近接可能であり、肝臓生検および末梢血細胞における抗原の検出を可能にするということが明らかである。モノクローナル抗体IGH 201、207、210および222の特性はむしろユニークなものである。なぜなら、同じエピトープに指向された他のモノクローナル抗体は高いバックグラウンドを生じ、特異的染色をしなかつたからである。例えば、モノクローナル抗体IGH 207、209および210はすべて同じエピトープを認識するが、IGH 209はすべての細胞タイプにおいてE1抗原を染色できず、一方、IGH 210はリンパ球のみを染色し、IGH 207はリンパ球および肝細胞の両方を染色する。本発明を用いると、天然のHCV蛋白抗原の検出に使用できる広範な抗体を当業者が製造することが可能になるはずである（性質としてはポリクローナルまたはモノクローナルいずれかのものを種々の種において）。

【0037】

一定のエピトープに対する一連の抗体を製造することの必要性は、抗体の挙動が、認識されるエピトープのみならずエピトープに対する親和性、溶解度、イソタイプ、および抗体が生成される種のごとき二次的な特性によっても決定されるという事実を反映する。それぞれの適用例に関し、異なる二次的特性を有する抗体が必要であるかもしれない。よって、かかる広範な抗体の製造により、IGH 201、207、210および222のように類似の特性を有する抗体のいくつかを同定でき、すなわち、宿主の生物学的試料中におけるHCVエンベロープ蛋白の存在が明らかになるであろう。実際、これらのエピトープが、宿主中で発現されたようなHCVエンベロープ蛋白に明らかに近接可能であるという知識は、本明細書に示したような *in situ*のみならず溶液中（例えば、血漿または血清中）でこれらの抗原を検出するアッセイを開発するに必要な情報を提供する。モノクローナル抗体IGH 201、207、210または222、あるいは同じエピトープに対して生成したが可溶性抗原の検出に最適な特徴を有する他の抗体を、可能ならば他の抗体と組み合わせて用いて、かかるアッセイを開発することもできる。

【0038】

文献一覧

Cannon, E., Ladner R., and McCoy D. *Phage-display technology. IVD Technology* 1996, Nov/Dec.

Current protocols in immunology. Eds Coligan J., Kruisbeek A., Margulies D., Shevach E., and Strober W. *Wiley Interscience,* 1992.

Dries V., Von Both I., Mueller M., Gerken G., Schirmacher P., Odenthal M., Bartenschlager R., Drebber U., Meyer Zum Bueschenfelde K.-H. And Dienes H.P. *Detection of Hepatitis C virus in paraffin-embedded liver biopsies of patients negative for viral RNA in serum.*

Hepatology 1999: 29: 223-229.

Guido M and Thung S. *The value of identifying hepatitis C virus in liver pathology specimens.* *Hepatology* 1996: 23: 376-379.

Hiramatsu N., Hayashi N., Haruna Y., Kasahara A., Fusamoto H., Mori C., Fukie I., Okayama H. and Kamada T. *Immunohistochemical detection of hepatitis C virus-infected hepatocytes in chronic liver disease with monoclonal antibodies to core, envelope and NS3 regions of the hepatitis C virus genome.* *Hepatology* 1992: 16: 306-311.

Kaito M., Watanabe S., Tsukiyama-Kohara K., Yamaguchi K., Kobayashi Y., Konishi M., Yokoi M., Ishida S., Suzuki S. and Kohara M. *Hepatitis C virus particle detected by immunoelectron microscopic study.* *J. Gen. Virol.* 1994: 75: 1755-1760.

Kashiwakuma T., Hasegawa A., Kajita T., Takata A., Mori H., Ohta Y., Tanaka E., Kiyosawa K., Tanaka T., Tanaka S., Hattori N. And Kohara M. *Detection of hepatitis C virus specific core protein in serum of patients by a sensitive fluorescence enzyme immunoassay.* *J. Immunol. Meth.* 1996: 190: 79-89.

Kohler and Milstein, (1975) *Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity.* *Nature* 256: 495.

Liang, T.J. (1996) *Hepatology elsewhere* 23: 376-379.

Ladner, R. Constrained peptides as binding entities. *Tibtech* 1995, 13:426-430.

Maclennan J. Engineering microprotein ligands for large-scale affinity purification.

Biotechnology 1995, 13:1181-1183.

Maertens G. and Stuyver L. Genotypes and genetic variation of hepatitis C virus. In: *The molecular medicine of viral hepatitis*. Ed: Harrison T.J. and Zuckerman A.J. 1997

Major M.E. and Feinstone S.M. The molecular virology of hepatitis C. *Hepatology* 1997: 25: 1527-1538.

Sansonno D., Cornacchillo V., Racanelli V. and Dammacco F. In situ simultaneous detection of hepatitis C virus RNA and hepatitis C virus-related antigens in hepatocellular carcinoma. *Cancer* 1997: 80: 22-33.

Sansonno D., Gesualdo L., Manno C., Schena F. and Dammacco F. Hepatitis C virus-related proteins in kidney tissue from hepatitis C virus-infected patients with cryoglobulinemic membranoproliferative glomerulonephritis. *Hepatology* 1997: 25: 1237-1244.

【0039】

【表1】

表 1

E 1 ベブチド	遺伝子型	名稱	#	aa
YVPRNSTGIVHNTINDCPNSLVYEAAADALIHTPCG	1a	V1V2	1071	192-226
YETRNVSGIYHVNICNSISIVYEADMMTATPCG	1b	V1V2	868	192-226
VEYRNSNSIMATNDCSNSLIVWOLEAVATIETCG	2a	V1V2	1019	192-226
VEYRNTSTSTWVNDCSNSLIVWOLEGAVLHTPCG	2c	V1V2	1074	192-226
LEFRNTSGLVLTINDCSNSLIVYEADWVLTHTPCG	3	V1V2	1008	192-226
INPRVNSLIVHVNICNSISIVYEADHHTLHTPCG	4	V1V2	1075	192-226
VPYRNASGIVHVNICNSISIVYEADNLITNAPEC	5	V1V2	1094	192-226
LTYGNSSGLYHVNICNSISIVYEADMLLHPC	6	V1V2	1023/1085	192-226
LNFANKSGLYHVNICNSISIVYEADGMLLHPC	7	V1V2	1334	192-225
LCYRASGIVHVNICNSISIVYEADMLLHPC	9	V1V2	1333	192-226
LEYRNASGLYHVNICNSISIVYEADLTLHPC	10	V1V2	1332	192-226
IVYEADMMTHTPCGIVHVNICNSISIVYEADTTLHPC	1b	V2V3	1036	212-244
VHNNNSERCVWATPTLAAVASPPTTIRHVD	1b	V3V4	1022	230-253
HYDILVGLGAAFCGSMAMVGDGGSFIVSQL	1b	HR	1150	261-280
SQFTTISPRNHETTQDGNSISIVPFGHTGHRDAMKNS	1b	VSC4	1176	289-327
STYPCHTGHHAMMAMMAMMNSFTDADPSQLT	1b	C4V6	1039	307-340

【表 2】

表 1 (続き)

E2ペプチド	遺伝子型	名稱	#	a
				a
HTRVSQAAASNTGQIYLSLPSQSAQKQLVNTM	1b	HVR I	1139	384-415
NTVGSQASLPSQSAQKQLVNTMINTMNTM	1b	HVR II/Cla	1123	395-428
LVNTMNTMNTMNTMNTMNTMNTMNTMNTM	1b	C1a	1119	413-447
NDSTQGTPAALVYTKRNSGCPERLASCRSLDKPQ	1b	C1b	1118	430-467
RSIDKPGQHGPPTTENNSPQRYCWN	1b	HVR II	1020	460-487
SDQRPCHYTAPEPGTIPASQVQYCFPS?	1b	C2a	1147	480-513
SOVCGPVICFPEPVVYDFTGVPYIYNG	1b	C2b	1143	500-530
GPTIHWGASDQVLLNTRIPRANPFGTMRNGTFTKTCGS	1b	V3-C3	1118	523-566
TKYCGSPCPNQIGAMNTLTCPTDCFKEP	1b	V4	1142	561-590
TDCFRHPEATYARGGSPMLPROMEPYPRLWHPCTVNTF	1b	C4a	16	583-627
TQNTIIFKVMYGVETRPEACWKR	1b	C4b	1141	621-648
EAACNKGRCEDLEDRSEUSFLLSTEQ	1b	C4c	1140	641-673
KITNRVSMFASEKPNVHINT	-	HVR I	485	394-416
HTTSTIAALPSQACQIQLVNT	-	HVR I	492	395-416
HVTCITLFLPQASQKQLVNT	-	HVR I	489	394-416
AHNABTQGMSGARQKQLVNT	-	HVR I	520	394-416
SIDTRGLVLSPEPSQIQLVNT	-	HVR I	846	394-416
SSTQSIIVSMWLSQGPQIQLVNT	-	HVR I	494	394-416
HTTIGIVVFFAEGPQPNHINT	-	HVR I	484	394-416
RANSIGLVSLETPQASQKQLVNT	-	HVR I	884	394-416
HVTGTLISLPRQASQKQLVNT	-	HVR I	940	394-416

【表3】

表 2

配列	#	a 値	I G H 2 2 2 による認識
HTVSGGAASNTGLVSLFPGSACKQLVN	1139	394-415	+
KTNTRLUVSFASGEKQKPHINT	485	394-416	+
HTTSTTLASLIFPGSACKQLVN	492	395-416	+
AHAAATLGTMPSLAKRKQLVN	520	394-416	+
SDTGGVLSIFPGSACKQLVN	606	394-416	+
SSTOSLVNNSQPGSACKQLVN	494	394-416	-
HTMAGTVRFPAEGERKQKPHINT	484	394-416	-
RASGGVLSIFPGSACKQLVN	884	394-416	-
HTVOTLISIFPGSACKQLVN	940	394-416	-
RTOGGIVSLESFGAKQDQLVN	490	394-416	-

I G H 2 2 2 と反応しないペプチド中の保守的ではい変異を太字で示す。

【図面の簡単な説明】

【図1】 図1は、H C V患者の肝臓生検において、モノクローナル抗体 I G H 2 2 2 により明らかとなったE 2抗原の染色を示す。新鮮凍結材料の4 μ m厚クリオスタッフ切片について、3工程の間接的イムノーベルオキシダーゼ法を用いる免疫組織化学的方法を行った（液体窒素で冷却したイソペンタン中で肝臓生検を即時凍結し、使用するまで-70℃保存した）。モノクローナル抗体 I G H 2 2 2 (精製I g G₁: 10 ng/ μ l)とともに切片を4℃で一晩インキ

ユーベーションした。二次抗体および三次抗体はそれぞれ、ベルオキシダーゼ抱合ウサギ抗マウスおよびベルオキシダーゼ抱合ブタ抗ウサギ IgG からなっていた（いずれも Dakopatts, Copenhagen, Denmark から得た；使用希釈率はそれぞれ 1/50 および 1/100）。各インキュベーションを室温で 30 分行い、次いで、リン酸緩衝化セイライン、pH 7.2 セイライン、pH 7.2 を 3 回交換することにより洗浄した。0.05% 3-アミノ-9-エチルカルバゾールおよび 0.01% H₂O₂ を含有する 100 mM 酢酸塩バッファー（pH 5.2）中で 15 分インキュベーションすることにより反応生成物を発色させ、免疫反応部位を明赤色に染色した。ヘモトキシリンで切片を対比染色した。対照（示さず）は、一次抗体と類似のイソタイプの無関係なモノクローナル抗体、あるいは発色物質のみからなっていた。これらの対照は一貫して陰性であった。写真は 25 倍に拡大したものを示す。最も濃い染色は肝細胞のみの中に HCV 抗原が存在することを示す（矢印参照）。

【図 2 A】 図 2 A は、HCV 患者の肝臓生検において、モノクローナル抗体 IgH 207 により明らかとなった E1 抗原の染色を示す。行った手順は、モノクローナル抗体濃度が 30 ng/μl であったことを除いて、図 1 で説明したのと同じである。写真は 10 倍に拡大したものを示し、リンパ球浸潤物中の細胞の染色が優勢である。最も濃い染色は、肝細胞および浸潤リンパ球中の HCV 抗原の存在を明らかにする（矢印参照）。

【図 2 B】 図 2 B は、HCV 患者の肝臓生検において、モノクローナル抗体 IgH 210 により明らかとなった E1 抗原の染色を示す。肝臓生検をホルムアルデヒドで固定し、パラフィン中に包埋した。熱（マイクロウェーブ法）およびプロテアーゼ消化により切片を前処理した。抗体濃度は 6 ng/μl であった。写真は、肝細胞の中の明確に染色された単離単核細胞を示し（矢印）、肝細胞はこのモノクローナル抗体では染色されない。

【図 3】 図 3 は、末梢血単核細胞中の細胞内 E1 抗原の、モノクローナル抗体 IgH 207 により明らかにされた染色を示す。末梢白血球（0.5 × 10⁶ 個）を 200 μl の PBS-0.1% サボニンに懸濁し、2 μg の IgH 207 を添加し、4°C で 25 分間反応させた。3 ml の PBS-0.1% サボニン

で細胞を3回洗浄し、次いで、PBS-0.2%NaN₃で3回洗浄した。最後に、細胞を250μlのPBS-0.2%NaN₃に再懸濁し、フローサイトメトリーにより分析した。単核細胞フラクション（右欄）に対してゲイティング（gating）した後、蛍光をプロットした（左欄）。試料1～5はHCV慢性キャリヤ由来であり、試料6は健康血液キャリヤ由来である。左欄は単核細胞フラクションに対するゲイティングの例（試料2および6）を示し、右欄はこれらの単核細胞において見出された蛍光を示す。対照試料はこのモノクローナル抗体では全く染色されないが、患者4（弱いシグナルが得られた）を除くすべてのHCV患者において著しい陽性シグナルが存在する。

【図4】 図4は、末梢血単核細胞中の細胞内E1抗原の、モノクローナル抗体IGH201により明らかとなった染色を示す。当該方法は図3について説明したのと同様であった。試料7～11はHCV慢性キャリヤ由来であり、試料12は健康血液キャリヤ由来である。左欄は単核細胞フラクションに対するゲイティングの例（試料7および12）を示し、右欄はこれらの単核細胞において見出された蛍光を示す。対照試料は濃いバックグラウンド染色を示すが、元の試料における反応は、検出できる2つの集団に基づいて容易に区別することができる。該2つの集団とは、対照と同様に染色される集団ならびに対照には見られない強い染色を示す第2の集団である。

【图1】

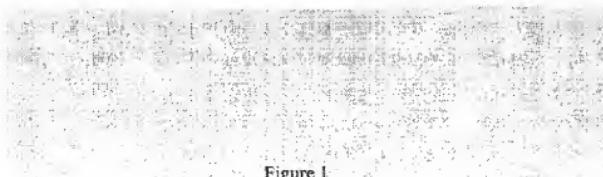
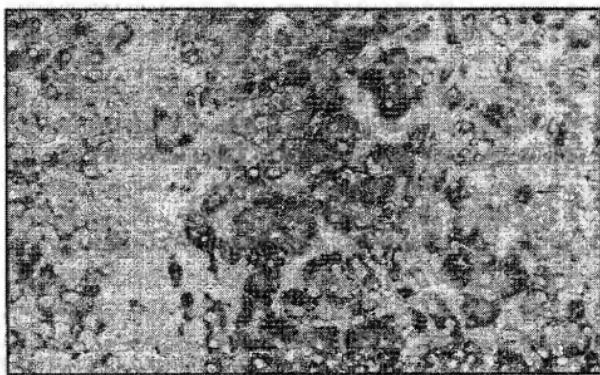


Figure 1

【図2a】



Figure 2a

【図2b】

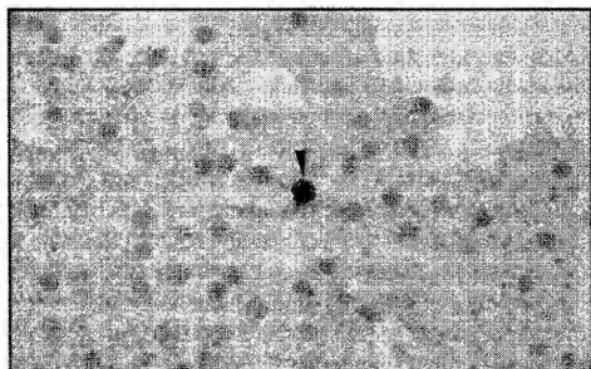


Figure 2b

【図3】

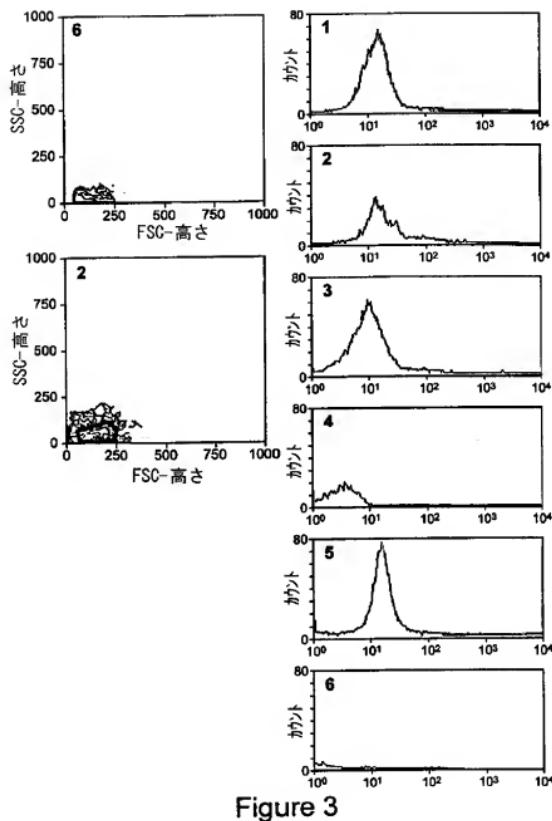


Figure 3

【図4】

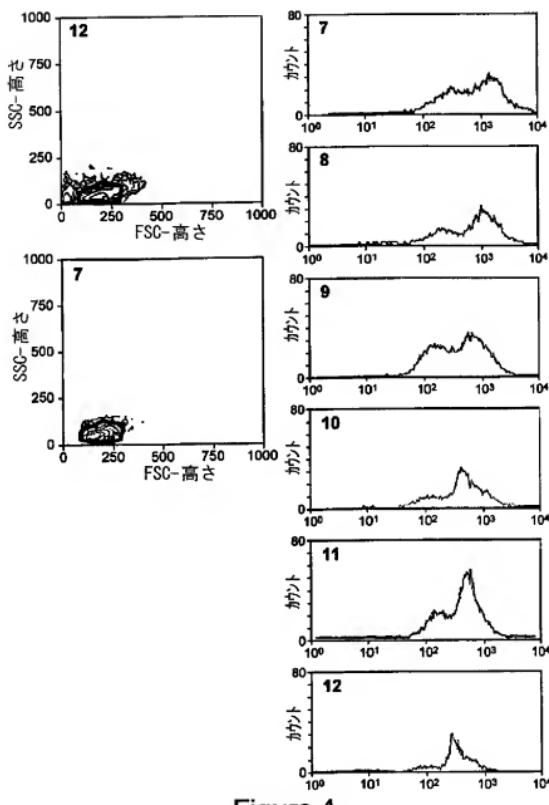


Figure 4

【国际调查报告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International Application No. PCT/EP 99/02154												
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 C07K15/10 C12N5/20 601N33/576 //C07K14/18														
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC														
B. FIELDS SEARCHED Main patent documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C07K GOIN														
Documentation searched other than main patent documentation to the extent that such documents are included in the fields searched														
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)														
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Category</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="padding: 2px;">X</td> <td style="padding: 2px;">WO 92 13892 A (ABBOTT LAB) 20 August 1992 (1992-08-20) page 2, line 32 -page 3, line 4 page 8, line 21-31 page 12, line 35 -page 13, line 7 page 13; table 2</td> <td style="padding: 2px;">1-13</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">X</td> <td style="padding: 2px;">WO 94 05311 A (DEAKIN RES LTD ;COMIS ALFIO (AU); FISCHER PETER (NO); TYLER MARGAR) 17 March 1994 (1994-03-17) page 9, line 16-32 * seq. 1D 8 page 30, line 31 -page 31, line 4 page 16, line 3-7 example 3</td> <td style="padding: 2px;">1-13</td> </tr> <tr> <td></td> <td style="padding: 2px;">-/-</td> <td style="padding: 2px;">-/-</td> </tr> </tbody> </table>			Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	WO 92 13892 A (ABBOTT LAB) 20 August 1992 (1992-08-20) page 2, line 32 -page 3, line 4 page 8, line 21-31 page 12, line 35 -page 13, line 7 page 13; table 2	1-13	X	WO 94 05311 A (DEAKIN RES LTD ;COMIS ALFIO (AU); FISCHER PETER (NO); TYLER MARGAR) 17 March 1994 (1994-03-17) page 9, line 16-32 * seq. 1D 8 page 30, line 31 -page 31, line 4 page 16, line 3-7 example 3	1-13		-/-	-/-
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.												
X	WO 92 13892 A (ABBOTT LAB) 20 August 1992 (1992-08-20) page 2, line 32 -page 3, line 4 page 8, line 21-31 page 12, line 35 -page 13, line 7 page 13; table 2	1-13												
X	WO 94 05311 A (DEAKIN RES LTD ;COMIS ALFIO (AU); FISCHER PETER (NO); TYLER MARGAR) 17 March 1994 (1994-03-17) page 9, line 16-32 * seq. 1D 8 page 30, line 31 -page 31, line 4 page 16, line 3-7 example 3	1-13												
	-/-	-/-												
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.												
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not concerned to be of particular relevance "B" earlier document but published on or after the international filing date "C" document which may throw doubts on priority, claim(s) or which is cited to establish the publication date of another claim or other special reason (as specified) "D" document relating to an art that discloses, uses, exhibition or other source "E" document published prior to the international filing date but later than the priority date cited														
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report												
30 September 1999		11/10/1999												
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. 8038 Potsdamerstr. NL - 10203 NV Potsdam Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 090 NL Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer												
		Covone, M												

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Application No
PCT/EP 99/02154

C (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Character of document, with indication where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DE 42 09 215 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 7 January 1993 (1993-01-07) page 2, line 40-42 page 2, line 56 page 4, line 55 -page 5, line 1 * page 29 seq. ID 12 claims 1,11 —	1-13
X	WO 93 18054 A (INNOGENETICS NV) 16 September 1993 (1993-09-16) * page 15 peptide XXb-2 example 23 page 60, line 5-23 —	1-13
A	WO 96 40764 A (US HEALTH) 13 December 1996 (1996-12-19) page 3, line 13-16 page 15, line 19-35 page 28, line 23 -page 29, line 18 —	1-13
A	MAERTENS G. ET AL.: "MAPPING OF HUMAN AND MURINE B CELL EPITOPES ON PURIFIED HEPATITIS C VIRUS E1 AND E2 PROTEINS" "AASLD ABSTRACTS" HEPATOLOGY, vol. 26, no. 4part2, October 1997 (1997-10), page 186A XP002084941 A232 the whole document —	6-8
A	HIRAMATSU N. ET AL.: "IMMUNOHISTOCHEMICAL DETECTION OF HEPATITIS C VIRUS-INFECTED HEPATOCYTES IN CHRONIC LIVER DISEASE WITH MONOCLONAL ANTIBODIES TO CORE, ENVELOPE AND NS3 REGIONS OF THE HEPATITIS C VIRUS GENOME" HEPATOLOGY, vol. 16, no. 2, 1992, pages 306-311, XP002084942 abstract page 308, left-hand column, line 27 -right-hand column, line 13 —	1,9-13
A	CHAN S-W. ET AL.: "HUMAN RECOMBINANT ANTIBODIES SPECIFIC FOR HEPATITIS C VIRUS CORE AND ENVELOPE E2 PEPTIDES FROM AN IMMUNE PHAGE DISPLAY LIBRARY" J.GENERAL VIROLOGY, vol. 77, 1996, pages 2531-2539, XP002084943 page 2532, left-hand column, line 32-35 page 2533; table 1 page 2537, right-hand column, line 18-27 —/—	6-8
3		

Form PCT/ISA/210 (continuation of several sheets) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In	International Application No
PCT/EP 99/02154	

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Section of document, with indication where appropriate, of the relevant passages	Reference to class No.
P,A	<p>SUZUKI, I. (1) ET AL: "Detection of the E1 protein of HCV in peripheral blood mononuclear cells and in lymphocyte infiltrates in the liver." HEPATOLOGY, (OCT., 1998) VOL. 28, NO. 4 PART 2, PP. 271A, MEETING INFO.: BIENNIAL SCIENTIFIC MEETING OF THE INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR THE STUDY OF THE LIVER AND THE 49TH ANNUAL MEETING AND POSTGRADUATE COURSES OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR TH, XP002116634 the whole document</p> <p>-----</p>	1-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members:

Int'l Search Application No.
PCT/EP 99/02154

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9213892	A 20-08-1992	AT 167522 T AU 662517 B AU 1362792 A CA 2101534 A DE 69225960 D DE 69225960 T EP 0569537 A ES 2118129 T JP 6505389 T	15-07-1998 07-09-1995 07-09-1992 01-08-1992 23-07-1998 21-01-1999 18-11-1993 16-09-1998 23-06-1994
WO 9405311	A 17-03-1994	AU 667578 B AU 4934693 A BR 9306984 A CA 2143823 A CN 1091138 A EP 0667786 A HU 71860 A JP 8500829 T NZ 255256 A	28-03-1996 29-03-1994 12-01-1999 17-03-1994 24-08-1994 23-08-1995 28-02-1996 30-01-1996 24-02-1997
DE 4209215	A 07-01-1993	AT 171710 T AU 652851 B AU 2197392 A CA 2089576 A DE 59209512 D WO 9301210 A EP 0551460 A EP 0581231 A ES 2123558 T JP 2774872 B KR 9710925 B ZA 9204950 A	15-10-1998 08-09-1994 11-02-1993 05-01-1993 05-11-1998 21-01-1993 21-07-1993 02-12-1998 16-01-1999 09-07-1998 02-07-1997 03-01-1994
WO 9318054	A 16-09-1993	AT 179716 T AU 671623 B BR 9305435 A CA 2102301 A DE 69324751 D EP 0589004 A EP 0891982 A JP 6505806 T NZ 249838 A NZ 299048 A US 5891640 A	15-05-1999 09-09-1996 27-12-1994 07-09-1993 10-06-1999 30-03-1994 20-01-1999 30-06-1994 28-10-1996 24-09-1998 06-04-1999
WO 9640764	A 19-12-1996	AU 6157996 A CA 2221313 A EP 0932114 A	30-12-1996 19-12-1996 01-04-1998

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	マーク (参考)
// C 12 N 15/02		C 12 R 1:91	
(C 12 P 21/08		C 12 N 5/00	B
C 12 R 1:91)		15/00	C

(81) 指定国 EP(AT, BE, CH, CY,
 DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
 LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ,
 CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML,
 MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE,
 LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), E
 A(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
 TM), AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA,
 BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU,
 CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE,
 GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS,
 JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
 LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN,
 MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU,
 SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM,
 TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA,
 ZW

(72) 発明者 マリー・アンジュ・ビュイス
 ベルギー、ヘーエ-9820メルセン、エドモン
 ト・ロンセストラート23番、ブルフ

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA14 BA33 BA51 GA05

HA15

4B064 AG27 AG33 CA10 CA20 CC24

DA03 DA15

4B065 AA92X AA96Y AB05 CA24

CA25 CA45 CA46

4H045 AA10 AA11 AA30 CA02 DA76

DA86 EA29 EA31 EA53 FA72